

Demonstration des fetalen Hämoglobins
in den Erythrocyten von
Blutausstrichen und eine einfache Methode
zur qualitativen Unterscheidung
von fetalem- und Erwachsenen-hämoglobin

von

KURT HERBST

Aus dem Institut für gerichtliche Medizin
der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. W. Laves

Demonstration des fetalen Hämoglobins
in den Erythrocyten von Blutaussstrichen
und
eine einfache Methode
zur qualitativen Unterscheidung
von
fetalem- und Erwachsenenhäoglobin

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
in der gesamten Medizin
verfaßt und einer
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Ludwig-Maximilians-Universität
zu München

vorgelegt von
Kurt Herbst

München 1959



Mit Genehmigung der
medizinischen Fakultät
der
Universität München

Referent: Prof. Dr. W. Laves

Dekan: Prof. Dr. K. Kollé

Tag der mündlichen Prüfung: 16. 6. 59

Literatur

1. ALLISON, A.: Science 122, 640 (1955).
2. BEAVEN, G.H., H. HOCH, E.R. HOLIDAY:
The hemoglobins of the human foetus
and infant. Biochem.J.49, 374 (1951).
3. ---, M. ELLIS, J.C. WHITE: Estimation
of small proportions of fetal hemo-
globin in blood. Nature 178, 857
(1956).
4. BETKE, K.: Der menschliche rote Blut-
farbstoff bei Fetus und reifem Or-
ganismus. Berlin 1954.
5. ---, Vergleichende Untersuchung der
Hitzedenaturierung von fetalem und
Erwachsenen-Hb. Naturwiss.40 (1953).
6. ---: Vergleichende Untersuchung der
Oxydation von fetalem und Erwachse-
nen-Oxy-Hb durch Natriumnitrit.
Naturwiss.40, 60 (1953).
7. ---: Über experimentelle Oxydation
menschlicher und tierischer Hämoglo-
bine. Fol.Haematol.75, 242 (1957).
8. ---, I. GREINACHER, E. LEBER: Über die
Bindung von Hämatin an Plasmaeiweiß.
Beitrag zur Methodik der Alkalidena-
turierung von Blutfarbstoff.
Biochem.Z.326, 1 (1954).
9. ---, E. KLEIHAUER: Experimentelle Be-
ladung von Erythrocytenstromata mit
Hämoglobin. Kl.Wochenschr.34, 101
(1956).

10. BETKE, K., P. SCHOLZ: Vergleichende Untersuchung der Oxydation von Oxy-Hb Neugeborener und Erwachsener durch Kaliumferricyanid bei verschiedener Sauerstoffspannung. Naturwiss.45, 88 (1958).
11. BRADA, Z.: Über die Alkalidenaturierung von Hämoglobin nach der Formaldehyd- einwirkung. Naturwiss.44, 444 (1957).
12. BROMBERGER, Y.M., M. SALZBERGER, A. ABRA- HAMOV: Alkali resistant type of hemo- globin in women with molar pregnancy. Blood 12, 1122 (1957).
13. COMBES, B.: Hémoglobines et hémoglobinoses. Étude électrophorétique des hémoglo- bines. Toulouse 1956.
14. COOK, CH.D., H.R. BRODIE, D.W. ALLEN: Measurement of fetal hemoglobin in newborn infants. Pediatrics (Spring- field)20, 272 (1957).
15. DERRIEN, Y., G. LAURENT: Étude spectro- photométrique de la fraction alcalino- résistante isolée de l'hémoglobine du nouveau-né par dénaturation fractionnée. C.r.Soc.Biol. 151, 137 (1955).
16. ---,---: Différenciation par leur teneur en isoleucine des hémoglobines alcalino- résistantes de l'Homme adulte et du nouveau-né. C.r.hebd.Séanc.Ac.Sc.241, 450 (1955).

17. DERRIEN, Y., G. LAURENT, M. BORGOMANO:
Isolement par dénaturation fractionnée
et étude des courbes de relargage de
la fraction alcalinorésistante des
carboxyhémoglobines de nouveau-né.
C.r.Séanc.Soc.Biol. 149, 137 (1955).
18. ---, ---, ---: Sur une protéine ac-
compagnant l'hémoglobine de l'Homme
adulte et sa concentration dans la
fraction alcalinorésistante isolée
de cette dernière. C.r.hebd.Séanc.
Acad.Scs. 242, 1538 (1956).
19. DIACONO, H., M. CASTAY: Différenciation
de l'antigénicité des hémoglobines
humaines HbA et HbF par utilisation
du sérum de Cobaye antiglobules rouges
humains d'adulte ou de nouveau-né.
C.r.Séanc.Soc.Biol. 150, 669 (1956).
20. FISHER, B.: Modifications in the alkali
denaturation test for fetal Hb.
Am.J.Clin.Path. 27, (1957).
21. GERALD, P.S., DIAMOND, L.K.: The diagnosis
of thalassemia trait by starch-block
electrophoresis. Blood 13, 61 (1958).
22. GREINACHER, I., E. GREINACHER, K. BETKE:
Spektrophotometrische Untersuchungen
im Infrarot an fetalem und bleibendem
Blutfarbstoff des Menschen.
Naturwiss. 40, 588 (1953).
23. HAJEK, S.: The importance of fetal Hb in
ascertaining the age of infants.
Čas.lék.čes. 951, 1225 (1955).

24. HALBRECHT, I., C. KLIBANSKI: Identification of a new normal embryonic hemoglobin. Nature 178, 794 (1956).
25. HAUROWITZ, F.: Zur Chemie des Blutfarbstoffs. Z.f.phys.Chem. 186, 143 (1936).
26. HOMMES, F.A., J. SATEMA-DRINKWARD, T.H.J. HUISMAN: The sulfhydryl groups of four different human hemoglobins. Biochim.Biophys.Acta 20, 564 (1956).
27. HUISMAN, T.H.J., H.K. PRINS: Chromatographic estimation of different kinds of human hemoglobin. Nature 175, 903 (1955), J.Lab.Clin.Med. 46, 255 (1955).
28. ITANO, H.A.: Human hemoglobins. Science 117, 89 (1953).
29. JONXIS, J.H.P., T.H.J. HUISMAN: The detection and estimation of fetal hemoglobin by means of the alkali denaturation test. Blood 11, 1009 (1956).
30. ---, H.K.A. VISSER: Determination of low percentages of fetal hemoglobin in blood of normal children. Am.J.Dis.Child. 92, 588 (1956).
31. KLEIHAUER, E.: Denaturierung von fetalem und bleibendem Hb des Menschen durch Salzsäure. Naturwiss. 44, 308 (1957).
32. ---, H. BRAUN, K. BETKE: Demonstration von fetalem Hb in den Erythrocyten eines Blutausrichs. Klin.Wschr. 35, 637 (1957).

33. KÖRBER, E.: Inaug.-Diss., Dorpat 1866.
Über Differenzen des Blutfarbstoffes.
Zbl.med.Wiss. 117 (1867).
34. KUBOWITZ, F.: Die Alkalidenaturierung
des menschlichen Hämoglobins.
Fol.haem. 75, 272 (1957).
35. KÜNZER, W.: Zur Identifizierung des fe-
talen Hb. Z.f.Kinderhlkd. 73, (1953)
265.
36. ---: Zur Bestimmung des fetalen Hb mit-
tels Alkalidenaturierung. Klin.Wschr.
35, 940 (1957).
37. ---: Untersuchungen über das Vorkommen
fetalen Hämoglobins bei Blutkrankheiten.
Z.f.Kinderhlkd. 76, 58 (1955).
38. ---: Nature 179, 477 (1957).
39. ---: Über den Blutfarbstoffwechsel ge-
sunder Säuglinge und Kinder.
Basel 1954.
40. ---, H. DRESCHER: Spektrophotometrische
Untersuchungen am Blutfarbstoff mensch-
licher Feten. Kl.Wschr. 34, 918 (1956).
41. ---, D. SAFFER: Vergleichende Untersu-
chung der Denaturierung sowie der Oxy-
dation von fetalem und Erwachsenen-
Oxy-Hb durch Kaliumchlorat.
Arch.exp.Path.u.Pharm. 223, 501 (1954).
42. ---, A. SCHÜTZ, E. SCHÜTZ: Vergleichende
Untersuchung der Spontanoxydation des
Blutfarbstoffes in Nabelschnur- und
Erwachsenenerythrocyten nach Glykolyse-
hemmung. Acta haem. 16, 137 (1955).

43. LARSON, D.L., H.M. RANNEY: Filter-paper-electrophoresis of human hemoglobin. J.Clin.Invest. 32, 1070 (1953).
44. LEHMANN, H., H. KAY: A possible source of error in the estimation of hemoglobin by photoelectric methods. Biochem.J. 59, IV (1955).
45. MARINONE, G., C. BERNASCONI: Das Verhalten des langsamen Hämoglobins des Erwachsenen bei Normalen und bei Thalassämie. Quantitative elektrophoretische Studie. Fol.haem. 2, 28 (1958).
46. MORRISON, M., J.L. COOK: Chromatographic fractionation of normal adult Oxy-Hb. Science 122, 920 (1955).
47. PENATI, F., P. LOVISETTO, G.L. TURCO: Ricerche mediante denaturazione acida frazionata. Haematol. 39, 157 (1955).
48. ---, G.L. TURCO, C. GRANDIS, P. LOVISETTO: Differenze di densità ottica fra emoglobina adulta e fetale nel loro spettro nell'ultravioletto. Haematol. 39, 149 (1955).
49. PONDER, E., P. LEVINE: Fetal and adult hemoglobins in the blood of infants affected with hemolytic disease of the newborn. Blood 4, 1264 (1949).
50. SCHELER, W.: Milieubedingte Eigenschaften des Hämoglobins. Fol.haem. 75, 252 (1957).
51. SMITH, E.W., C.L. CONLEY: Filter paper electrophoresis of human hemoglobin. Bull.Johns Hopkins Hosp. 93, 94 (1953).

52. SPEAT, T.H.: Identification of abnormal hemoglobins by means of paper electrophoresis. J.Lab.Clin.Med. 41, 161 (1953).
53. VAN DER SCHAAF, P.C., T.H.J. HUISMAN:
The estimation of some different kinds of human Hb. Rec.Trav.Chim.P.B. 74, 563 (1955).

Das Interesse an den menschlichen Hämoglobinen hat im letzten Jahrzehnt, nicht zuletzt durch die Entdeckung neuer pathologischer Typen, erheblich zugenommen. Große Beachtung fand seit jeher die Tatsache, daß es neben dem normalen Hämoglobin des Erwachsenen (Hb A) noch ein normales fetales Hämoglobin (Hb F) gibt. Dies ist schon seit 1910 bekannt. Aber schon früher, 1866, wurde durch KÖRBER (33), der das Verhalten des Hämoglobins verschiedener Tierspezies bei der Denaturierung durch Alkalien und Essigsäure untersucht hatte, auf die größere Resistenz des Plazentarblutes gegenüber diesen Stoffen hingewiesen und damit die Grundlage für die Entdeckung und Erforschung des fetalen Blutfarbstoffes geschaffen. In der Tat ist die größere Resistenz des fetalen Hämoglobins gegenüber Alkalien und Säuren eine seiner bedeutendsten Eigenschaften und sie spielt auch heute noch die größte Rolle bei der Untersuchung und Trennung der beiden normalen menschlichen Hämoglobine A und F. Seit den frühen Anfängen der Hämoglobinforschung sind noch viele andere wichtige Unterschiede dieser beiden Typen entdeckt worden. Die Literatur darüber ist äußerst umfangreich. Die Studien, die auf der verschiedenen Resistenz gegenüber Alkalien beruhen, nehmen dabei die wichtigste Stellung ein, besonders HAUROWITZ (25) hat schon in den dreißiger Jahren darüber berichtet.

Weitere Untersuchungen anderer Autoren zeigten andere Verschiedenheiten auf, zum Beispiel bei der Elektrophorese, der photometrischen und der infrarot-spektrophotometrischen Untersuchung. So LARSON und RANNEY (1953, Filtrierpapierelektrophorese)(43), BEAVEN, HOCH und HOLIDAY (Elektrophorese und Spektroskopie, 1951), GREINACHER, GREINACHER und BETKE (1953, Infrarot-Spektrophotometrie), BETKE (1953, Hitzedenaturierung, Oxydation durch Na-Nitrit) (2, 22, 5, 6), SPAFF (1953, Elektrophorese) (52). Auf das Auftreten des Hb F bei Blutkrankheiten, z.B. bei der Erythroblastose, wiesen u. a. PONDER und LEVINE (49) hin, um nur einige der wichtigen Arbeiten zu nennen die sich mit Hb F beschäftigen. Soweit sie bis zum Jahre 1953 veröffentlicht wurden, hat sie BETKE (4) in seiner umfassenden Monographie über das fetale und das Erwachsenenhäemoglobin, die 1954 herausgegeben wurde, berücksichtigt. Seitdem ist eine beträchtliche Anzahl neuer Arbeiten über dieses Gebiet der Blutforschung erschienen, wie die von KÜNZER (1953, Identifizierung des Hb F)(35), SMITH und CONLEY (1953, Filtrierpapierelektrophorese)(51), BETKE, GREINACHER und LEBER (1954, Alkalidenaturierung) (8), KÜNZER und SAFFER (1954, Denaturierung und Oxydation mit Kaliumchlorat)(41) und nicht zuletzt die Monographie von COMBES (1956)(13), der sich besonders eingehend mit der Elektrophorese der normalen und pathologischen Häoglobine des Menschen befaßt, und viele andere mehr.

Das fetale Hämoglobin wird normalerweise nur im Blute der Feten und Neugeborenen gefunden. Seine Bedeutung ist noch nicht hinreichend geklärt, auch über die Mechanismen, welche die Produktion von Hb A und Hb F kontrollieren herrscht noch Ungewißheit. Das normale Vorkommen des Hb F im Neugeborenen und im Fetus ist jedenfalls nicht abhängig von den intra- oder extrauterinen Lebensbedingungen. Allein das Alter des Feten und des Neugeborenen von dem Zeitpunkt der Konzeption an gerechnet scheint dabei ausschlaggebend zu sein. In neuerer Zeit haben COOK, BRODIE und ALLEN (1957)(14) genauere Untersuchungen über das prozentuale Vorkommen des Hb F durchgeführt. Die Ergebnisse wurden mit der Methode der Alkalidenaturierung gefunden, auf die später noch näher eingegangen wird. Bei diesen Messungen wurden im Blute von 29 Neugeborenen mit einer Tragzeit von weniger als 36 Wochen in 27 Fällen mehr als 90% Hb F festgestellt. Von 123 Neugeborenen mit einer Tragzeit von mindestens 36 Wochen und mehr, wurden in 120 Fällen weniger als 90% Hb F gemessen. Nach einer Tragzeit von 36 Wochen tritt nach den genannten Autoren ein umgekehrtes Verhältnis zwischen Tragzeit und Prozentgehalt des Blutes an Hb F ein, durchschnittlich wurden 2,5 bis 4,0% weniger Hb F je zusätzliche Woche Tragzeit festgestellt,

bei 35 Wochen	92%,
" 37	" 87%,
" 39	" 82%,
" 41	" 77%
und " 43	" 69%.

Diese Werte stimmen mit denen ungefähr überein, die bei ähnlichen Untersuchungen auch von JONXIS und VISSER (1956) (30) gefunden wurden. KÜNZER (1954)(39) berichtet, daß in der ersten Woche post partum der Aufbau von Hb F den Abbau noch überwiege, dann aber der Abbau des Hb F bis zur zehnten Woche mehr und mehr zunehme, bis dann in der zehnten Woche das Hb F bis auf 5% reduziert sei. Nach der 8. - 10. Woche überwiege dann der Aufbau von Erwachsenen-Hämoglobin. Die Bestimmung des Prozentgehalts und die dabei erhaltenen Werte wurden von HÁJEK (1955)(23) zur Feststellung des Alters von Feten und Neugeborenen in der gerichtlichen Medizin benutzt. Er bestimmte den alkaliresistenten Hämoglobinanteil im Blutstropfen und fand sehr zuverlässige Ergebnisse, wenn Faktoren ausgeschlossen wurden, die die Spezifität der Reaktion gefährden. JONXIS und VISSER (1956)(30) fanden, daß der Gehalt an Hb F 20 Wochen nach der Geburt bereits bis auf etwa 5% gesunken ist. Eine sehr kleine Menge davon wurde aber auch später noch gefunden. Erst bei einem Alter von 1 1/2 Jahren war im Blute normaler Kinder kein Hb F mehr nachweisbar. Das bedeutet, daß der Gehalt an Hb F zu diesem Zeitpunkt kleiner als 1% sein muß, ein Gehalt von weniger als 1% ist mit den bekannten Messungsmethoden nicht mehr erfassbar. Von verschiedenen Autoren wurde auf Grund von Beobachtungen, die bei der Untersuchung des Blutes sehr junger Embryonen gemacht wurden, angenommen, daß noch ein drittes, normales Hämoglobin existiere, welches sie Hb P nennen. Es scheint ausschließlich in den ersten Wochen der

intrauterinen Entwicklung vorzukommen. Die Alkalidenaturierung des Hämoglobins 7 - 12 Wochen alter Embryonen ergibt Zersetzungskurven, die von denen der beiden bekannten normalen Hämoglobine deutlich abweichen. Die Kurve der Denaturierungsgeschwindigkeit dieses dritten normalen Hämoglobins liegt zwischen den beiden typischen Kurven der schon bekannten Hämoglobine A und F. HALBRECHT und KLIBANSKY (1956)(24) bestätigen ebenfalls die Existenz eines dritten normalen, embryonalen Hämoglobins, das sie bei Untersuchungen am Blute eines zehnwöchigen Embryonen fanden. Die elektrophoretische Untersuchung ergab, daß dieses embryonale Hb langsamer wanderte als das Hb F der Feten und Neugeborenen. Vergleiche mit Hb F aus Nabelschnurblut zeigten deutliche Unterschiede. Beobachtungen, die diese Feststellung bestätigen, wurden auch von ALLISON (1955)(1) gemacht, wie auch von KÜNZER (1957) (38), der in weiteren Untersuchungen ebenfalls fand, daß die elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit dieses Typs langsamer ist als die des Hb F, und daß seine Alkaliresistenz zwischen Hb A und Hb F liegt. KÜNZER erklärt das Vorkommen dieser drei normalen menschlichen Hämoglobine auf eine sehr einfache Weise, indem er je eines einer der drei Perioden der fetalen Hämopoese zuteilt: Hb P der mesoplastischen Periode, Hb F der hepato-lienalen Periode, und Hb A der medullaren Periode. Die spektrophotometrischen Untersuchungen ergaben nach KÜNZER und DRESCHER (1956)(40),

daß das Spektrum dieses embryonalen Hb-Typs vollkommen mit dem Spektrum des Hb F übereinstimmt und die Tryptophanbande im UV bei 289,8 $m\mu$, die als typische Eigenschaft des fetalen Hb gilt, wurde auch beim embryonalen Hämoglobin gefunden. KÜNZER und DRESCHER nehmen daher an, daß sich das Hb F strukturell sehr eng an das Hb F anschließt.

Das normale fetale Hämoglobin wird unter Umständen aber auch im Blute von Erwachsenen gefunden. Das Vorkommen von Hb F beim Erwachsenen kann physiologisch bedingt sein, doch die größere Bedeutung hat sein Auftreten bei verschiedenen Erkrankungen des Blutes. Es wurde schon eingangs erwähnt, daß PONDER und LEVINE (1949)(49) schon auf die Rolle hingewiesen haben, die das Hb F bei der Neugeborenen-Erythroblastose spielt. BROMBERGER, SALZBERGER und ABRAHAMOV (1957)(12) stellten fest, daß im Blute schwangerer Frauen zuweilen ein beachtlicher Prozentsatz fetalen Hämoglobins zu finden ist, besonders in der zweiten Hälfte der Gravidität. Diese auch von anderen Autoren beschriebene Beobachtung wurde als eine Folge des Überwechselns fetaler roter Blutzellen durch die Placenta in den mütterlichen Kreislauf erklärt. Auch wurde angenommen, daß - vor allem im letzten Trimenon - vielleicht eine exzessive Produktion von Hb F durch das embryonale hämatopoetische System der Mutter, das durch hormonale Faktoren im Verlaufe der Gravidität reaktiviert wurde, stattfinden könnte. Es wurde auch darauf hin-

gewiesen, daß akute Veränderungen, die zu Beginn der Gravidität in der Konzentration des Choriongonadotropins auftreten, eine Rolle bei der Stimulation des embryonalen hämatopoetischen Systems der Mutter spielen könnten. BROMBERGER, SALZBERGER und ABRAHAMOV hatten Gelegenheit, diese Verhältnisse bei vier Fällen von Molengravidität zu studieren, die dadurch charakterisiert ist, daß bei ihr große Mengen von Choriongonadotropin produziert werden. Bei normalen, gesunden Schwangerschaften fanden sie im Blute der Mütter in den ersten drei Monaten der Gravidität nur 0,5 - 2,2% Hb F. Bei den Frauen mit einer Molengravidität wurden durchwegs bedeutend höhere Werte gefunden. Nach der operativen Entfernung der Mole sanken diese Hb F-Werte entsprechend dem Absinken des Choriongonadotropin-Titers im Urin, der vor der Operation einen Höchstwert erreicht hatte.-

Der Hb-Typ, der bei den Thalassämien (Thalassaemia major und minor) gefunden wird, wurde bei beiden Formen der Krankheit bis in die jüngste Zeit als mit dem Hb F identisch betrachtet. Die Thalassaemia major (Mb. Cooley, Erythroblastenanämie) beruht auf einem genetischen Defekt, der sich beim homozygoten Individuum in dieser schweren Anämieform äußert, sie ist - abgesehen von den klinischen Erscheinungen am Patienten - auch mit den Methoden der Hb-Untersuchung an dessen Verhalten leicht feststellbar. Anders ist es mit der Thalassaemia minor (Microzytämie). Diese ist charakterisiert durch abnormal geformte

Erythrocyten, bei denen das mittlere Zellvolumen verringert ist. Es wird heute allgemein angenommen, daß dieses Syndrom die heterozygote Form der Thalassaemia major darstellt, obwohl gegen diese Annahme von verschiedenen Autoren Einwände gemacht wurden. Bezüglich der klinischen Erscheinungen bei der Thalassaemia minor ist die Stellung der Diagnose oft sehr schwierig, da die pathologischen Veränderungen (Erythrocyten, Hämoglobin) bei den ganz leichten Formen sehr geringfügig sein können. ITANO (28) rechnet noch 1953 in seiner Veröffentlichung über die menschlichen Hämoglobine sowohl das Hb der Thalassaemia major wie auch das der Microcytämie zum Hb F. PENATI, LOVISETTO und TURCO (1955) (47) kamen bei ihren Untersuchungen über die Säuredenaturierung verschiedener Hämoglobine zu dem Ergebnis, daß das Hb der Thalassaemia major und Hb F praktisch identisch seien, stellten aber einen deutlichen Unterschied dazu beim Hb der Microcytämie fest, das mehr dem normalen Hb A ähnelte. GERALD und DIAMOND (1958) (21) haben mit Hilfe der Stärkeblock-Elektrophorese Untersuchungen darüber angestellt. Bei dieser Methode der Elektrophorese zerfällt das Hb A in drei Komponenten: Die Hauptkomponente A_1 , die schnelle kleinere Komponente, die vor der Komponente A_1 zur Anode wandert und dieser so eine pfeilspitzenartige Form verleiht, und schließlich eine kleine, wesentlich langsamere Komponente A_2 . Diese ist bei der Microcytämie charakteristisch vergrößert. Eine große Anzahl von Untersuchungen des Hämoglobins bei den Thalassämien stammt von italienischen Autoren - das

ist verständlich, da diese Krankheiten in Europa fast ausschließlich auf das Mittelmeergebiet beschränkt sind. MARINONE und BERNASCONI (1958)(45), die diese langsame A_2 -Komponente des Hb A "Hb A β " nennen, stellten fest, daß sie nicht mit Hb F identisch ist, da sie bedeutend langsamer wandert als dieses. Beim normalen Erwachsenen macht diese langsame Komponente nach DERRIEN, LAURENT und BORGOMANO (1955 und 1956)(16, 18) 0,5 - 1,7% aus, sie wurde von ihnen auf Grund ihres Gehalts an Isoleucin bestimmt, der bei Hb F 1,84%, bei Hb A $_1$ 0,33% und bei Hb A $_2$ 3,25% beträgt. Es liegt also bei der Microcytämie nur eine Vergrößerung der A_2 -Komponente vor und nur bei der Thalassaemia major tritt tatsächlich Hb F auf. Dieses kann aber nicht als pathologisches Hb angesehen werden, da es ja physiologisch im Feten und Neugeborenen vorkommt. Auch ist es nicht spezifisch für den Mb. Cooley, es kommt auch bei verschiedenen anderen Hämoglobinopathien vor (etwa der Hämoglobinose C) und auch bei anämischen Zuständen (Perniciosa, chronische aregenerative Anämien). Es wird angenommen, daß das Auftreten von Hb F bei all diesen Erkrankungen auf die Auswirkung eines kompensatorischen, hämoglobinoetischen Mechanismus zurückzuführen ist, den der Organismus unter besonderen Bedingungen benötigt.

Unterschiede zwischen Hb A und Hb F.

Die Unterscheidung der beiden Typen A und F ist durch ihr verschiedenes Verhalten bei einer Reihe von Untersuchungen möglich, die hier kurz zusammengestellt werden sollen.

	Hb A	Hb F
Kristallform:	orthorhombisch,	triclinisch
Isoelektrische Punkte:	6,91-6,94	6,97-7,04
Tryptophanbande im UV:	2910 Å	2898 Å
N-terminale Reste:	6 Valin	2 Valin
Alkaliresistenz:	niedrig	hoch
Säureresistenz:	niedrig	hoch
Elektrophoretische Wanderung:	schnell	langsam
Aminosäuren-		
Zusammensetzung: (die wesentlichsten Unterschiede)		
Threonin	5,49	6,51 (g/100g Hb)
Serin	4,46	5,83
Prolin	4,96	4,22
Valin	10,91	9,51
Methionin	1,40	1,84
Isoleucin	0,33	1,84
Tyrosin	3,85	3,18
Histidin	8,31	7,38

(Nach VAN DER SCHAAF und HUISMAN, 1955 (53)).

Die Sulfhydrylgruppen beider Typen wurden von HOMMES, SANTEEMA-DRINKWAARD und HUISMAN (1956) (26) untersucht. Sie stellten fest, daß Hb A 8,28 und Hb F 5,67 (ausgedrückt als Halb-Cystin-Reste/Mol Hb) enthielten.

Alle gebräuchlichen Methoden der Differenzierung beider Typen, auch die der quantitativen Bestimmung stützen sich im wesentlichen auf diese Unterschiede. Zu erwähnen wäre noch die Unterscheidung auf serologischem Wege, wie sie u.a. von DIACOMO und CASTEY (1956)(19) beschrieben

wird. (Als Antigen-Antikörper-Reaktion mit Hilfe des Cobaye-Serums). Doch werden die serologischen Methoden an Bedeutung weit übertroffen von den anderen Verfahren wie das der Alkalidenaturierung, der Spektrophotometrie, der Chromatographie und der Elektrophorese.

Oxydation.

Die Unterschiede beider Typen wurden auch hinsichtlich ihrer Oxydationsgeschwindigkeit untersucht. BETKE (1957)(7) hat bei seinen Untersuchungen über die experimentelle Oxydation menschlicher und tierischer Hämoglobine bedeutende Unterschiede zwischen Hb A und Hb F gefunden. Die Reaktionsgeschwindigkeit bei der Oxydation des Hb F ist $2 \frac{1}{2}$ mal größer als bei Hb A. Die Oxydationskurve des Erwachsenenblutes war dabei einheitlich, die des Nabelschnurblutes zeigte dagegen einen Verlauf, der von BETKE als eine Summenkurve zweier mit verschiedener Geschwindigkeit ablaufender Vorgänge interpretiert wurde, was der Tatsache entspricht, daß das Nabelschnurblut sowohl Hb F als auch Hb A enthält. Da bei normaler Sauerstoffspannung der Luft der Blutfarbstoff nicht ganz gesättigt wird, sondern immer ein kleiner Prozentsatz sauerstofffreien Hämoglobins bestehen bleibt, wurden weitere Versuche darüber von BETKE und SCHOLZ (1958)(10) unter verschiedenen Sauerstoffspannungen durchgeführt. Sie fanden dabei, daß bei Anwesenheit von reinem Sauerstoff die Reaktion verlangsamt wird (die Geschwindigkeit betrug etwa $\frac{1}{3}$ von der bei Luft). Die gefundenen, charakteristischen Unterschiede zwischen Hb A und Hb F

blieben aber auch unter diesen Bedingungen erhalten. KÜNZER, SCHÜTZ und SCHÜTZ (1955)(42) waren schon bei früheren, ähnlichen Versuchen zu dem Ergebnis gekommen, daß das Bestreben zur spontanen Oxydation beim fetalen Hb gut doppelt so groß ist wie beim bleibenden Hb.

Spektrophotometrie.

Das fetale Hämoglobin hat eine größere optische Dichte als das Hämoglobin des Erwachsenen.

PENATI, TURCO, GRANDIS und LOVISETTO (1955) (48) studierten den Zusammenhang zwischen dem Prozentgehalt an Hb F in Mischungen beider Typen und den Extinktionswerten im UV-Bereich der Tryptophankerbe (288 - 291 m μ). Die künstlich hergestellten Mischungen beider Hämoglobine waren vorher jeweils zur gleichen Konzentration von 405 mM gebracht worden.-

BEAVEN, ELLIS und WHITE (1956)(3) weisen darauf hin, daß die UV-spektrographische Messung der Anteile beider Hb-Typen in einem Gemisch ungenau wird, wenn der Anteil an Hb F geringer als 10% ist. Dies hatten auch schon DERRIEN und LAURENT (1955)(15) festgestellt.

JONXIS und VISSER (1956)(30) schlugen deshalb vor, zur Umgehung dieses Nachteils die Erfassung kleinerer Mengen fetalen Blutfarbstoffes auf spektrophotometrischem Wege mit einer anderen Art der Messung durchzuführen und deshalb die Zunahme der Extinktion, die durch die Bildung von alkalischem Hämochromogen bei der Denaturierung verursacht wird, nicht bei 650 m μ zu messen, wie es bisher gebräuchlich war, sondern bei 576 m μ . Dies hatte auch BETKE schon erprobt. Bei der Wellenlänge 650 m μ

ist die Extinktion des Hämochromogens etwa 10 mal größer als die des Oxy-Hb, so daß beim Vorliegen kleinerer Anteile von Hb F in der Mischung die Extinktionswerte bald so hoch werden, daß die geringe Erhöhung durch die spätere Denaturierung des Hb F kaum noch wahrnehmbar ist. Bei 576 m μ ist dagegen die Extinktion des Oxy-Hb drei mal größer als die des Hämochromogens. So findet dann während des Denaturierungsvorganges keine Erhöhung, sondern eine Senkung der Extinktion statt und es wird auch die Denaturierung kleinerer Anteile an Hb F wahrnehmbar. Man kommt auf diese Weise bei der Messung bis an einen Hb F-Gehalt von 1% heran. Für die Genauigkeit der Messungen ist natürlich auch die Präzision des verwendeten Meßgerätes nicht bedeutungslos. LEHMAN und KAY (1955)(44) weisen besonders auf diesen Umstand hin und stellen fest, daß nur die Verwendung hochpräziser Meßgeräte wirklich exakte Ergebnisse liefern kann, während weniger genaue Instrumente mit einiger Sicherheit nur bei Proben mit einem Prozentgehalt von wenigstens 15% Hb F verwendet werden können.

Chromatographie.

Von den verschiedenen Methoden der Chromatographie zur Trennung und Bestimmung von Hb A und Hb F hat sich nach HUISMAN und PRINS (1955)(27) die Säulenchromatographie mit dem Kationen-Austauschharz "Amberlite IRC 50" am besten bewährt. HUISMAN und PRINS haben dieses Verfahren hinsichtlich seiner Verlässlichkeit bei der Bestimmung von Hb A und Hb F

geprüft. Sie führten vor den Untersuchungen die auf dem üblichen Wege gewonnenen Hb-Lösungen in die CO-Form über. Säulen mit einem Ausmaß von 20 zu 0,9 cm, die bis zu einer Höhe von 13 cm mit Amberlite IRC 50 (XE 64) gefüllt waren, wurden zur Trennung der Hämoglobine benutzt. Das Austauschharz war vorbehandelt worden. Das Gleichgewicht in der Säule wurde mit etwa 200 ml des ersten Elutionspuffers, eines Zitronensäurepuffers von p_H 6,50 (konstante Na-Jonenkonzentration 0,20) eingestellt. Um die Laufgeschwindigkeit des Effluenten zu erhöhen ist es notwendig, während der Elution von 30 - 60 mg CO-Hb eine Änderung des Puffers vorzunehmen, es wird zu Puffern mit einer höheren Na-Jonenkonzentration übergegangen. Bei einem effluieren Volumen von etwa 6 ml und kurz vor dem Erscheinen des CO-Hb F wird ein Puffer mit einer Na-Jonenkonzentration von 0,25 über dem Harz zugegeben. Die effluieren Fraktionen werden während der ersten Stunden bei einer Maximalgeschwindigkeit von 0,6 ml/30' gesammelt. Für die Trennung von CO-Hb A und CO-Hb F ist eine langsame Laufzeit notwendig. Die Fraktionen werden dann schließlich auf 4,0 ml verdünnt und die Extinktion wird mit einem Spektrophotometer bei 5700AU gemessen. Um die Bildung von Met-Hb zu vermeiden, wurde bei einer Temperatur von 0°C gearbeitet. Die gleichen Autoren beschreiben auch eine einfachere und schnellere Methode der Säulenchromatographie. Bei dieser werden die effluieren Fraktionen nicht gesammelt, sondern die

verschiedenen Hb-Typen auf den Säulen als getrennte Bänder sichtbar gemacht. Eine flache Cuvette aus klarem Lucite mit einem Ausmaß von 20 zu 3 zu 0,5 cm wird bis zu einer Höhe von 15 cm mit dem gleichen, vorher beschriebenen Harz gefüllt, dann an beiden Enden mit Baumwolle verschlossen. 1 ml von annähernd 2%iger Konzentration des Materials das chromatographiert werden soll wird auf die Oberfläche des Harzes aufgebracht. Es wird ein Na-Citrat-Zitronensäure-Puffer mit einer Na-Jonenkonzentration von 0,15 und einem p_H -Wert von etwa 6 verwendet. Die Pufferlösung fließt mit einer Geschwindigkeit von 20 ml in der Stunde durch die Cuvette. Eine gute Trennung der Hämoglobine wurde von den Autoren beobachtet, nachdem in zehnstündiger Dauer 200 ml der Pufferlösung die Cuvette passiert hatten. Diese Methode kann mit mehreren Cuvetten gleichzeitig in einem Kühlschrank ausgeführt werden. Die Prozentsätze der einzelnen Hämoglobine werden durch die Messung eines Diapositivs der Cuvette ermittelt. Es ergab sich dabei, daß sich das Hb F am schnellsten bewegt, dann folgt das Hb A. Quantitativ wurden aus den künstlichen Gemischen beider Typen mit bekanntem Gehalt von Hb F 97% wiedergewonnen, von Hb A bis zu 99%, sofern bei einer Temperatur gearbeitet wurde, die nicht höher als 10°C war. Die gleichen Beobachtungen wurden von MORRISON u. COOK bei Oxy-Hb A und F gemacht und es wurden auch hier dieselben Ergebnisse erzielt. (1955)(46).

Elektrophorese.

Während bei den chromatographischen Methoden die Geschwindigkeit der Lageveränderung bei Hb F größer ist als bei Hb A, findet man die umgekehrten Verhältnisse bei der Elektrophorese, wenn eine Pufferlösung von p_H 6,5 und eine Ionenstärke von 0,1 gewählt wird. Das Hb A wandert dann schneller als das Hb F. Es ist möglich, daß die Ladungsunterschiede des Hb-Moleküls auch bei der chromatographischen Trennung wichtig sind, auch die Struktur des Moleküls und die Länge der Peptidketten könnten dabei einige Bedeutung haben und den Unterschied bei den elektrophoretischen und den chromatographischen Wanderungsverhältnissen erklären.

Von den verschiedenen Arten der Elektrophorese hat sich für die Bestimmung der Hämoglobine A und F in den letzten Jahren die Stärkeblock-Elektrophorese als besonders gut geeignet erwiesen. MARINONE und BERNASCONI (1958) (45) berichten darüber. Die gereinigten Oxy-Hb-Lösungen aus dem Blut werden in Co-Hb übergeführt und die Elektrophorese in einer Veronal-Na-Pufferlösung von p_H 8,6 und $\mu = 0,1$, mit einer Spannung von 5 Volt/cm und einer Wanderungsdauer von 48 Stunden durchgeführt. Bei diesem Vorgehen tritt die langsame Komponente des Hb A (Hb A₂ oder Hb A β) - wie schon früher erwähnt - gut hervor. MARINONE und BERNASCONI fanden einen durchschnittlichen Gehalt von etwa 2,17% Hb A β . Die Wanderungsgeschwindigkeit des Neugeborenen-Hb, das seltsamerweise eine homogene Fraktion zeigte, lag zwischen derjenigen des Hb A β und der des Hb A, welches

am schnellsten wanderte. Die Fraktion Hb A β wurde bei Neugeborenen erst zu Beginn des dritten Monats nach der Geburt gesehen, die Quote ist zunächst niedrig, steigt aber langsam an um im 7. Lebensmonat den Wert des Erwachsenen zu erreichen. Zu diesem Zeitpunkt ist praktisch kein Hb F mehr nachweisbar. Soviel zur Elektrophorese der Hämoglobine, Andere Methoden und ihre Ergebnisse sind in der Literatur sehr häufig beschrieben worden, besonders COMBES (1956)(13) hat sich in seiner Monographie damit befaßt.

Alkalidenaturierung.

Eine der wichtigsten Methoden zum Studium und zur Bestimmung der Hämoglobine ist die Alkalidenaturierung. - Im alkalischen Milieu, besonders deutlich bei p_H -Werten zwischen 12 und 13, wird gelöstes Oxy-Hb denaturiert. Die subjektiv zu beobachtende Farbveränderung von rot nach braun kann auch objektiv auf photometrischem oder photoelektrischem Wege erfaßt werden. Aus den sich ändernden Absorptionswerten kann man die zu jeder Zeit vorhandenen Oxy-Hb-Konzentration berechnen, unter der Voraussetzung, daß der Unterschied in der Absorption proportional der Konzentration des Oxy-Hb, und die zeitliche Änderung der Absorption nach der Alkalisierung proportional der Denaturierungsgeschwindigkeit ist. Dies scheint aber nach KUBOWITZ (1957)(34) nicht der Fall zu sein. Er wies nach, daß die zeitliche Änderung der Lichtabsorption von Oxy-Hb-Lösungen nicht direkt proportional der Denaturierungsgeschwindigkeit ist; er schließt daraus, daß die Alkalidenaturierung kein einfacher Vorgang ist, sondern

aus mehreren hintereinander oder parallel verlaufenden Reaktionen besteht, deren Geschwindigkeiten sich bei p_H -Variationen verschieden ändern. Abgesehen aber von Erwägungen darüber, wie die Vorgänge bei der Alkalidenaturierung geartet sein könnten, ist sie doch die verbreitetste Methode die zur Bestimmung und Messung der verschiedenen Hämoglobine in einer Lösung angewandt wird.

Zwei Wege des Vorgehens sind dabei möglich. Die optische Methode und die Fällungsmethode. Die optische Methode beruht auf der spektrophotometrischen Bestimmung der Denaturierungsgeschwindigkeit des Hb F welches einer 0,1 N NaOH ausgesetzt wird. Die Fällungsmethode beruht an sich auf dem gleichen Prinzip, nur wird hier das Hb, das in der ersten Minute der Reaktion durch Alkali denaturiert wurde, und hauptsächlich aus Hb A besteht, ausgefällt und durch Filtration entfernt. Das restliche Hb, hauptsächlich Hb F, wird spektrophotometrisch gemessen. Bei der optischen Methode wird also die Denaturation durch die Differenz der Lichtabsorption des Oxy-Hb und des optisch davon verschiedenen Denaturierungsproduktes gemessen. Bei der Fällungsmethode wird ein denaturiertes Protein ausgefällt. Es ist unsicher, ob bei beiden Methoden das gleiche Material gemessen wird (JONXIS und HUISMAN, 1956 (29)). Die Fällungsmethode ist bisher häufiger verwendet worden. Alle Verbesserungen die an diesen beiden Methoden versucht und beschrieben wurden, beabsichtigen eine Vergrößerung der Genauigkeit bei der quantitativen Erfassung kleiner und kleinster Mengen fetalen Hämoglobins. Auch bei

der Messung gleicher Hb-Lösungen mit beiden Methoden ergaben sich beträchtlich differierende Ergebnisse. Solche Versuche wurden auch von JONXIS und HUISMAN gemacht. Sie fanden, daß man mit der Fällungsmethode bei hohen Konzentrationen von Hb F zu niedrige Werte erhält. Die erhaltenen Werte decken sich mit der tatsächlich vorhandenen Menge nur in einem Bereich von 40 - 70% Hb F. Die Ergebnisse mit der optischen Methode sind im Vergleich dazu besser. Die Durchschnittsabweichung beträgt hier nur 2%, während sie bei der Fällungsmethode bis zu 7% ausmachen kann. Wird der Gehalt an Hb F geringer als 10%, dann wird die optische Methode allerdings nach und nach ungenauer, bei Hb F-Gehalten unter 5% ist sie überhaupt nicht mehr zuverlässig. Die Fällungsmethode gibt in solchen Fällen wiederum zu hohe Werte. Daß man mit ihr bei hohen Hb F-Konzentrationen zu niedrige Werte erhält, könnte durch die Annahme erklärt werden, daß vielleicht auch unvollständig denaturiertes Hb durch den Ausfällungs- und Filtrationsprozeß entfernt wurde. Dieses Hb ist noch nicht in die Hämochromogenverbindung übergeführt und wird deshalb spektrophotometrisch nicht als denaturiertes Protein erfaßt. Das Hämoglobin, das in Lösung bleibt wenn die Fällungsmethode auf Blutproben Erwachsener angewandt wird, ist wahrscheinlich nicht nur Hb F, es können noch CO-Hb und andere Komponenten in der Lösung sein. Die verschiedenen Verhältnisse bei der Methoden wurden von KÜNZER (1957)(36) näher untersucht. Gleichzeitig prüfte er die Möglichkeit der Verwendung von Cyanhämoglobin für die

Bestimmungen mit beiden Methoden. Bei der optischen Methode stimmten die Ergebnisse für Cyanhämglobin und Oxy-Hb überein, bei der Fällungsmethode entsprachen die über Cyanhämglobin erhaltenen Werte vollkommen den tatsächlichen Werten, wohingegen die über Oxy-Hb gefundenen bei hohen und mittleren Hb F-Anteilen am Gesamtblutfarbstoff um etwa 5% zu niedrig lagen. Unter der Grenze von 8% ist, wie schon erwähnt, eine sichere Bestimmung mit der optischen Methode nicht mehr möglich. Hier bietet die Fällungsmethode sowohl bei Oxy-Hb als auch bei Cyanhämglobin gute Ergebnisse. Die verschiedenen Methoden der Alkalidenaturierung sind also keineswegs gleichwertig, sondern jeweils für hohe oder niedrige Anteile an Hb F besser geeignet. Die beste Möglichkeit sehr hohe, mittlere und sehr niedrige Anteile zu bestimmen, scheint die Fällungsmethode bei Verwendung von Cyanhämglobin zu bieten.

JONXIS und VISSER (1956)(30) schlagen zur Verbesserung der Ergebnisse die Verwendung der Wellenlänge 576 ~~m μ~~ bei der Messung vor. Sie konnten auf diese Weise Hb F-Anteile bis zu 1% herunter bestimmen. Einen anderen Vorschlag machte FISHER (1957)(20), der die optischen Messungen bei der Wellenlänge 550 ~~m μ~~ durchführt, um auch kleine Mengen von Hb F erfassbar zu machen. Die Stärke des Alkali bestimmt er durch Titration gegen N/10 HCl, dies ruft eine vollständige Denaturierung des Hb A hervor, das in der ersten Minute des Denaturierungsvorganges noch vorhanden ist. Die Filtration ersetzte er durch Zentrifugieren, um Verun-

reinigungen durch Fasern des Filtrierpapiers zu vermeiden und ein größeres Volumen zu gewinnen.

In diesem Zusammenhange ist noch eine Mitteilung von BRADA (1957)(11) interessant, in der er die Alkalidenaturierung nach der Einwirkung von Formaldehyd schildert. Durch die Zugabe von Formaldehyd zu Hb wird eine Steigerung der Alkaliresistenz hervorgerufen. Etwa 30% der Gesamtmenge des Hb werden resistenter. BRADA führte dies zuerst auf die Heterogenität des Hb zurück und widmete dieser Vermutung einige Untersuchungen, er fand große Unterschiede bei verschiedenen Anämien, Schlüsse auf eine Heterogenität des Hb ließen seine Ergebnisse aber nicht zu.

Bei der Alkalidenaturierung mit der Fällungsmethode findet man immer eine kleine Extinktion, der nach der routinemäßigen Berechnung ein geringer Betrag an Hb F entsprechen würde. Es handelt sich dabei um Mengen von etwa 1% des Gesamtfarbstoffes. Auch bei verlängerter Alkalieinwirkung wird diese Restextinktion nicht kleiner. So ist es unwahrscheinlich, daß es sich dabei um noch nicht denaturiertes Hb handelt. Der fragliche Farbkörper ergibt eine positive Benzidinprobe. BETKE, GREINACHER und LEBER (1954)(8) beobachteten, daß diese Restextinktion größere Werte annahm, wenn die Denaturierung anstatt an Hämolysaten aus gewaschenen Erythrocyten an solchen aus Vollblut vorgenommen wurde. Sie vermuteten, daß das Auftreten dieser Extinktion durch die Anwesenheit von Plasma bedingt sein könnte und untersuchten dieses Phänomen näher. Der Vergleich der Alkalidenaturierung von Häm-

lysaten aus gewaschenen Erythrocyten und Hämolysaten aus Vollblut ergab im ersten Falle immer die bekannte Restextinktion von 1%, im anderen Falle wurden Restextinktionen gefunden, die bei manchen Proben bis zu 10% "alkaliresistenten Hämoglobins" entsprachen hätten, wobei es gleichgültig war, ob die Denaturierung auf 10 Minuten ausgedehnt oder die Konzentration der Lauge verdoppelt wurde. Die Differenz zwischen Vollblut und gewaschenen Erythrocyten war stets vorhanden. - Bei der Alkalidenaturierung wird Blutfarbstoff in alkalisches Hämatin-Globin umgewandelt, das durch Drittelsättigung mit Ammonsulfat ausfällbar ist. Das Filtrat ist ungefärbt, d.h., der Porphyrin-Eisen-Komplex bleibt in irgend einer Weise mit dem denaturierten Globin in Verbindung. BETKE, GREINACHER und LEBER zeigten nun, daß das Filtrat gefärbt wird, wenn sich Plasma mit im Denaturierungsansatz befindet. Diese Färbung ist durch einen Körper bedingt, der ein charakteristisches Absorptionsspektrum besitzt, das von dem des Oxy-Hb und des Hämatin-Globins different ist aber dem Spektrum einer leicht alkalischen Lösung von Chlorhäm in mit Plasmazusatz sehr ähnelt. Auch diese Substanz geht nach Zusatz von Alkali und Drittelsättigung ins Filtrat. Die genannten Autoren leiten daraus ab, daß im Denaturierungsansatz befindliches Plasma, und zwar ein Anteil der bei der Drittelsättigung mit Ammonsulfat nicht ausgefällt wird, sich mit Hämatin zu einem filtrierbaren Farbkörper verbindet, falls die Bindung des Hämatins an das denaturierte Globin gelöst wird. Wenn also bei

der Alkalidenaturierung die Fällungsmethode angewendet werden soll, so darf nur mit Filtraten aus gewaschenen Erythrocyten gearbeitet werden, da bei der Bestimmung von geringen Mengen Hb F eine Verunreinigung mit Plasma zu beträchtlichen Fehlern führen kann.

Säuredenaturierung.

Es war bisher bekannt, daß Hb F bei der Denaturierung mit Essigsäure doppelt so resistent ist wie Hb A. Bei der Hb-Bestimmung über salzsaures Hämatin zeigte sich dagegen, daß der Zersetzungsprozeß in $n/10$ HCl bei beiden Blutfarbstoffen mit gleicher Geschwindigkeit abläuft. Es scheint also sehr von der Wahl der Versuchsanordnung und des sauren Milieus abzuhängen, ob die Säuredenaturierung Möglichkeiten der Bestimmung bietet oder nicht. KLEIHAUER (1957) (31) ist es gelungen eine größere Resistenz des fetalen Hb auch gegen Salzsäure nachzuweisen. Der Blutfarbstoff wurde als Cyanhämglobin einer Lösung ausgesetzt, die neben Salzsäure auch Ammonsulfat enthielt. Dadurch fiel der denaturierte Farbstoff jeweils sofort aus. 4,0 ml einer Cyanhämglobinlösung wurden rasch mit 1,94 ml einer gesättigten Ammonsulfatlösung vermischt, die 3% n HCl enthielt. Es trat eine fortschreitende Trübung auf. In bestimmten Zeitabständen wurde durch Zusatz von 0,06 ml 2 n NaOH die Reaktion unterbrochen und filtriert. Im Filtrat wurde dann der Gehalt an noch vorhandenem Cyanhämglobin bestimmt. Als Vergleichslösung dienten 4,0 ml der Cyanhämglobinlösung von der ausgegangen worden war, mit dem Zusatz von 2,0 ml Wasser. Der noch un-

denaturierte Farbstoff im Filtrat ergab bei der spektrophotometrischen Bestimmung die für Cyanhämoglobin typische Kurve mit dem Maximum bei 540 m μ .

Über weitere Untersuchungen der Säuredenaturierung des Hämoglobins berichten auch PENATI, LOVISETTO und TURCO (1955)(47), die dazu 4 n Essigsäure verwendeten. Es wurden dabei die bei der Alkalidenaturierung üblichen Methoden - die optische und die Fällungsmethode - benutzt und es wurde gefunden, daß bei der Anwendung der Fällungsmethode auf die Säuredenaturierung, im Gegensatz zur alkalischen Denaturierung, keine Möglichkeit besteht, den Prozentsatz des säureresistenten Hämoglobins zu ermitteln, da die Unterschiede für die Hämoglobine verschiedener Herkunft zu gering sind. Bei der optischen Methode erreichte das Hb A konstante Extinktionswerte früher als das fetale Hb. Diese Befunde von PENATI, LOVISETTO und TURCO dürften allerdings durch die oben zitierten Untersuchungen von KLEIHAUER aus dem Jahre 1957 überholt sein. Trotzdem lassen die Vorteile, die die Alkalidenaturierung mit den beiden Methoden bei der Bestimmung von fetalem Hb bietet, die Bestimmung durch Säuredenaturierung weniger günstig erscheinen. Doch bietet die Behandlung des Hämoglobins in saurem Milieu andere interessante Möglichkeiten des Studiums seiner Eigenschaften, die nicht unbeachtet bleiben dürfen. So berichten KLEIHAUER, BRAUN und BETKE (1957) (32) über die Möglichkeit der Herauslösung von Hb aus den Erythrocyten durch saure Pufferlösungen. Es ist auf diese Weise möglich, den

in den einzelnen Erythrocyten noch ungelösten, resistenten Blutfarbstoff sichtbar zu machen. Bei diesen Untersuchungen wurden in Alkohol fixierte Plutausstriche bei einer Temperatur von 37°C mit einer Zitronensäure-Phosphat-Pufferlösung von p_{H} 3,4 - 3,6 extrahiert. Nach dieser Behandlung kann man mikroskopisch das Fehlen des Hb in den Erythrocyten des Erwachsenenblutes feststellen, während unter den gleichen Bedingungen behandelte Erythrocyten aus Nabelschnurblut nach der Behandlung noch reichlich Hb enthalten. Diese raschere Extraktion von Hb A bei den genannten p_{H} -Werten wurde auch an Filtrierpapierstreifen beobachtet, die mit reinen Hb A und Hb F-Lösungen getränkt worden waren. KLEIHAUER, BRAUN und BETKE weisen darauf hin, daß dieses Verfahren eine Möglichkeit bietet zu entscheiden, ob der Prozentsatz an Hb F, der im Blute der Neugeborenen und Säuglinge vorkommt, in einer getrennten Population vorliegt, oder ob es auch Erythrocyten gibt, die beide Hämoglobine enthalten. Die Autoren vermuten, daß letzteres der Fall sei. - Auch der gegenteilige Vorgang, nämlich die Beladung von Erythrocytenstromata mit Hb, ist nach BETKE und KLEIHAUER (1956) (9) möglich. Danach kann ein Austausch von Blutfarbstoff durch die Erythrocytenmembran in zwei Richtungen stattfinden. Dies gilt sowohl für homologes als auch für heterologes Hämoglobin. Schwemmt man gewaschene Erythrocytenstromata in einer konzentrierten, wäßrigen Hb-Lösung auf, so diffundiert Hb in die Stromata hinein und läßt sich dort nach Herstellung der Isotonie durch Zusatz von NaCl fixieren. Stromata von Erwachsenenerythrocyten können so mit Hb F beladen werden und auch fetale Stromata mit Hb A.

Experimenteller Teil.

- I. Demonstration des fetalen Hämoglobins in den Erythrocyten eines Blutausstrichs.
- II. Eine einfache Methode zur qualitativen Unterscheidung von fetalem Hämoglobin und Erwachsenen-hämoglobin.

Die großen Unterschiede die zwischen dem Hämoglobin des Erwachsenen (Hb A) und dem fetalen Hämoglobin (Hb F) bestehen, wurden bis vor kurzem nur mit Hilfe der Untersuchung von Blutfarbstofflösungen studiert. Erst in den Jahren 1956 und 1957 zeigten, wie schon erwähnt, BETKE, KLEIHauer und BRAUN (9, 32) daß es auf Grund der verschieden großen Resistenz beider Typen gegenüber Säuren und Laugen möglich ist, zumindest diesen Unterschied im Erythrocyten selbst nachzuweisen und sichtbar zu machen. Die Veröffentlichung der Untersuchungsergebnisse darüber durch die genannten Autoren regten zu den im folgenden beschriebenen Versuchen an.

Material und Methodik.

Es wurde Blut von Erwachsenen, Nabelschnurblut reifer Neugeborener und das Blut frisch ausgestoßener Feten verwendet.

Davon wurden Ausstriche auf Objektträger angefertigt, außerdem wurden etwa 1 cm breite Streifen Filtrierpapier (Whatman No. 1) mit Erwachsenenblut bzw. Nabelschnurblut oder Fetalblut getränkt. Sowohl die Blutausstriche als auch die getränkten Filtrierpapierstreifen wurden in Methylalkohol fixiert. Ferner wurde eine Zitronensäure-Phosphat-Pufferlösung

mit einem p_H -Wert von 3,5 hergestellt, der p_H -Wert der Lösung wurde mit dem Beckman- p_H -Meter kontrolliert.

- I. Die Ausstriche vom Blute Erwachsener, der Feten und Neugeborenen (Nabelschnurblut) wurden immer paarweise untersucht und behandelt. Beim Nabelschnurblut handelte es sich um das Blut voll ausgetragener Neugeborener, das Alter der Feten, deren Blut verwendet wurde, war 5 - 6 Monate; je ein Paar dieser Ausstriche, z.B. ein Ausstrich mit Erwachsenenblut und einer mit Nabelschnurblut, wurde zusammen in normalem, unbehandeltem Zustand nach der Fixierung mit Methylenblau (250 mol, 5') gefärbt. Ein weiteres Paar der gleichen Blutausstriche wurde 10 Minuten lang in eine Stehcuvette, die die Pufferlösung enthielt, eingestellt. Ein weiteres Paar dann für 15 Minuten. Das Verfahren wurde bei Zimmertemperatur durchgeführt. Nach den genannten Einwirkungszeiten der Pufferlösung auf die Blutausstriche wurden diese der Lösung entnommen, an der Luft getrocknet und in der gleichen Weise gefärbt wie die unbehandelten Ausstriche. Es wurde sehr darauf geachtet, daß immer die gleichen Bedingungen bei der Behandlung und Färbung aller Präparate eingehalten wurden.

Die gefärbten Präparate, unbehandelte und behandelte, wurden dann unter dem Mikroskop verglichen. Bei den ersten Versuchen wurden die behandelten Blutausstriche nach der Entnahme aus der Pufferlösung und Trocknung nochmals fixiert. Es zeigte sich aber, daß dann die anschließende Färbung keine befriedigenden Er-

gebnisse brachte. Aus diesem Grunde wurden die weiteren Präparate nach der beschriebenen Behandlung nicht mehr nochmals fixiert, das führte dann zu den vorliegenden Ergebnissen.

Ergebnisse.

Die unbehandelten und die mit Pufferlösung behandelten Blutaussstriche wurden nach der Färbung unter dem Mikroskop verglichen. Die unbehandelten Erythrocyten des Erwachsenenblutes und des Fetalblutes oder Nabelschnurblutes ähnelten sich im Aussehen hinsichtlich der Intensität der Färbung. Bei den Präparaten, die 10 Minuten lang in der Pufferlösung belassen worden waren, wurde bereits ein deutlicher Unterschied zwischen den einzelnen Blutarten beobachtet. Die Erythrocyten des Erwachsenenblutes waren nur noch sehr schwach gefärbt, d.h., fast hämoglobinfrei, während die fetalen Erythrocyten im Vergleich dazu eine noch stärkere Färbung aufwiesen, ebenso auch die Erythrocyten des Nabelschnurblutes.

Bei den Präparaten, die 15 Minuten lang der Einwirkung der Pufferlösung ausgesetzt waren, war der Unterschied noch deutlicher. Bei den Ausstrichen aus Erwachsenenblut war dann durchwegs das leere Gerüst der Erythrocyten sichtbar. Sie zeigten sich praktisch hämoglobinfrei, während die Erythrocyten des Nabelschnurblutes und des Fetalblutes sich in Aussehen und Färbung nicht wesentlich von den Erythrocyten der gleichen Art unterschieden, die nur 10 Minuten lang in der Pufferlösung behandelt worden waren. Die fetalen Erythrocyten schienen ein wenig geschrumpft, wiesen aber noch einen beträchtli-

chen Gehalt an Hämoglobin auf. Ebenso die Erythrocyten des Nabelschnurblutes, doch wurden bei diesen immer einige gefunden, die ganz leer zu sein schienen oder zumindest nur noch sehr wenig Hb enthielten. Aus Abbildung 1 sind die beschriebenen Befunde deutlich ersichtlich.

Zu Abbildung 1:

- a) Erwachsenenerythrocyten vor und nach
der Behandlung,
- b) Nabelschnurerythrocyten " " "
- c) fetale Erythrocyten " " "

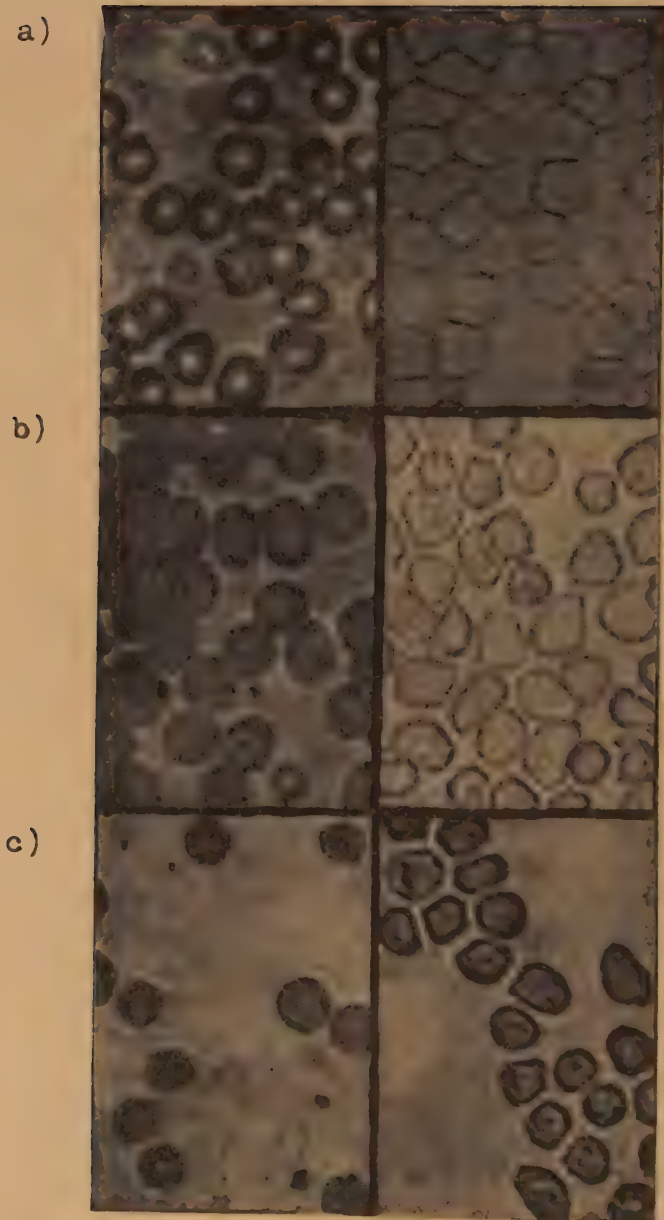


Abbildung 1

Diskussion.

Die Ergebnisse, die der mikroskopische Vergleich der normalen und der in Pufferlösung behandelten Blutaussstriche zeigt, bestätigen die von KLEIHAUER, BRAUN und BETKE gemachten Beobachtungen und zeigen außerdem, daß dieses Vorgehen auch bei Zimmertemperatur zum Erfolg führt. Wie aus Abbildung 1 hervorgeht, bieten die Erwachsenenerythrocyten und auch die Erythrocyten des fetalen Blutes nach der Behandlung ein einheitliches Bild: Die Erythrocyten des Erwachsenenblutes lassen nur noch leere Stromata erkennen, die fetalen Erythrocyten weisen noch eine beträchtliche Füllung auf. - Anders ist es bei den Erythrocyten des Nabelschnurblutes. Das Hämoglobin scheint hier nicht gleichmäßig weit aus den einzelnen Erythrocyten herausgelöst zu sein. Man sieht deutlich, daß auch in den Präparaten mit Nabelschnurblut einzelne Erythrocyten vollkommen leer geworden sind, während andere noch eine gute Färbung zeigen, die aber beträchtliche Unterschiede in der Intensität aufweist. Diese Beobachtung legt die Vermutung nahe, daß es im Nabelschnurblut einzelne Erythrocyten gibt, die nur Hämoglobin vom Typ A enthalten. Die eingangs genannten Autoren geben in ihrer Veröffentlichung der Vermutung Ausdruck, daß die beiden Typen Hb A und Hb F im Nabelschnurblut wohl in gemeinsamen Populationen vorliegen, sie schließen aber die Möglichkeit des Vorkommens von Erythrocyten mit reinem Hb einer Art im Nabelschnurblut nicht aus. Die Annahme, daß es im Nabelschnurblut Erythrocyten gibt, die

zumindest das Hämoglobin des Erwachsenen in reiner Form enthalten, scheint nach den vorliegenden Ergebnissen berechtigt.

Das granulierte Aussehen des Inhalts der behandelten fetalen und Nabelschnurerythrocyten weist darauf hin, daß hier kein unverändertes, normales, fetales Hb vorliegt, sondern ein Denaturierungsprodukt desselben, das aus ihm während der Behandlung in der Pufferlösung entstanden ist.

II. Jeweils ein Streifen des Filtrierpapiers, der mit Erwachsenenblut getränkt worden war, und einer mit Nabelschnurblut oder Fetalblut, wurden gemeinsam in die Pufferlösung eingetaucht. Auch diese Versuche wurden bei Zimmertemperatur (18 - 20°C) durchgeführt. In einer Reihe von Versuchen wurde die Zeit bestimmt, bei der mit dieser Behandlung der blutgetränkten Filtrierpapierstreifen die besten Ergebnisse erzielt werden konnten. Diese Zeit lag zwischen 60 und 120 Minuten.

Nach der Behandlung in der Pufferlösung wurden die Streifen getrocknet und immer je eine Serie von vier Streifen untersucht. (Erwachsenenblut behandelt und unbehandelt, Nabelschnur- oder Fetalblut behandelt und unbehandelt). Dabei wurde folgendermaßen verfahren:

Aus dem blutgetränkten Teil der Streifen wurden mit Hilfe eines Lochers kreisrunde Scheibchen von gleicher Größe ausgestanzt. Die gleiche Anzahl ausgestanzter Scheibchen von jeder Probe wurde gesondert in ein Reagensglas gegeben. Nach Zusatz von 4 ml n NaOH wurde 30 Minuten lang im Schüttelapparat extrahiert, dann von Papier-

fasern abzentrifugiert und die klare Lösung mit Natriumdithionit reduziert.

Dann wurden die Extinktionen der einzelnen Papierextrakte im Unicam-Spektrophotometer zwischen 700 und 420 m μ gemessen.

Zur Ermittlung der Zeitverhältnisse bei der Herauslösung des Hämoglobins aus dem Blut der Streifen durch die Pufferflüssigkeit, wurden Streifen mit Erwachsenenblut und Fetal- oder Nabelschnurblut gesondert auf die gleiche Weise untersucht und zwar nach 1-, 2-, 4- und 6-stündiger Behandlungsdauer.

Ergebnisse.

Nach 60 Minuten dauernder Einwirkung der Pufferlösung auf das Blut zeigte sich schon ein deutlicher Unterschied zwischen den Streifen mit Erwachsenenblut und den Streifen mit Fetalblut oder Nabelschnurblut. Die mit Erwachsenenblut getränkten Streifen waren deutlich heller geworden als die mit fetalem Blut getränkten. Noch viel deutlicher wurde der Unterschied nach zweistündiger Einwirkung des Puffers auf das fixierte Blut. Vor der Behandlung war die Farbe der verschiedenen Blutsorten annähernd gleich. (Abbildung 2).

Der gleiche Versuch wurde auch mit Filtrierpapierstreifen durchgeführt, bei denen das Blut vorher nicht fixiert worden war. Hier wurden zwar die gleichen Beobachtungen gemacht, die Unterschiede traten aber in wesentlich schwächerer Form auf, da ein beträchtlicher Teil der unfixierten Erythrocyten in der Lösung vom Filtrierpapier abgeschwemmt worden war.

Zu Abbildung 2:

- 1 = unbehandeltes Erwachsenenblut,**
- 2 = Erwachsenenblut nach einer Behandlung
von 60 Minuten.**
- 3 = Erwachsenenblut nach 120 Minuten
Behandlung.**
- 1', 2', 3' = bei der linken Serie fetales
Blut, rechts Nabelschnurblut -
unbehandelt und nach 60 und 120 Minu-
ten Behandlungszeit.**

Die spektrophotometrischen Messungen an den aus den Streifen gewonnenen Extrakten zeigten den Unterschied der Löslichkeit noch deutlicher und objektiver. Das Absorptionsmaximum der Lösungen lag bei 565 $m\mu$. Die Tabellen I und II zeigen die gefundenen Extinktionen zwischen 700 und 420 $m\mu$ für unbehandeltes Erwachsenenblut, 2 Stunden lang behandeltes Erwachsenenblut, unbehandeltes Feten- bzw. Nabelschnurblut und 2 Stunden lang behandeltes Fetenblut oder Nabelschnurblut.

Die Extinktionskurven der Extrakte (Abbildungen 3 und 4) zeigen den Unterschied besonders anschaulich.

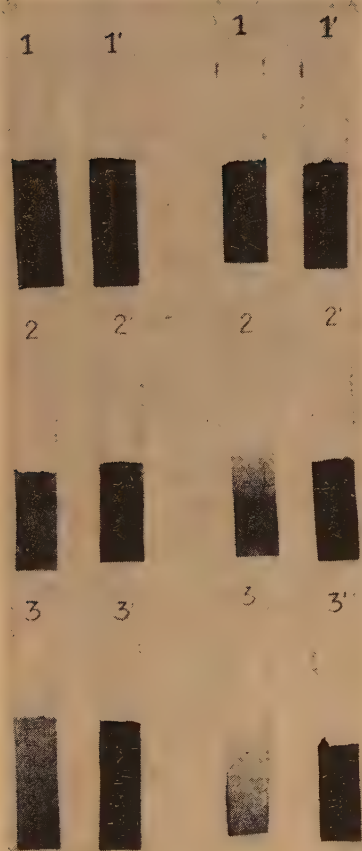


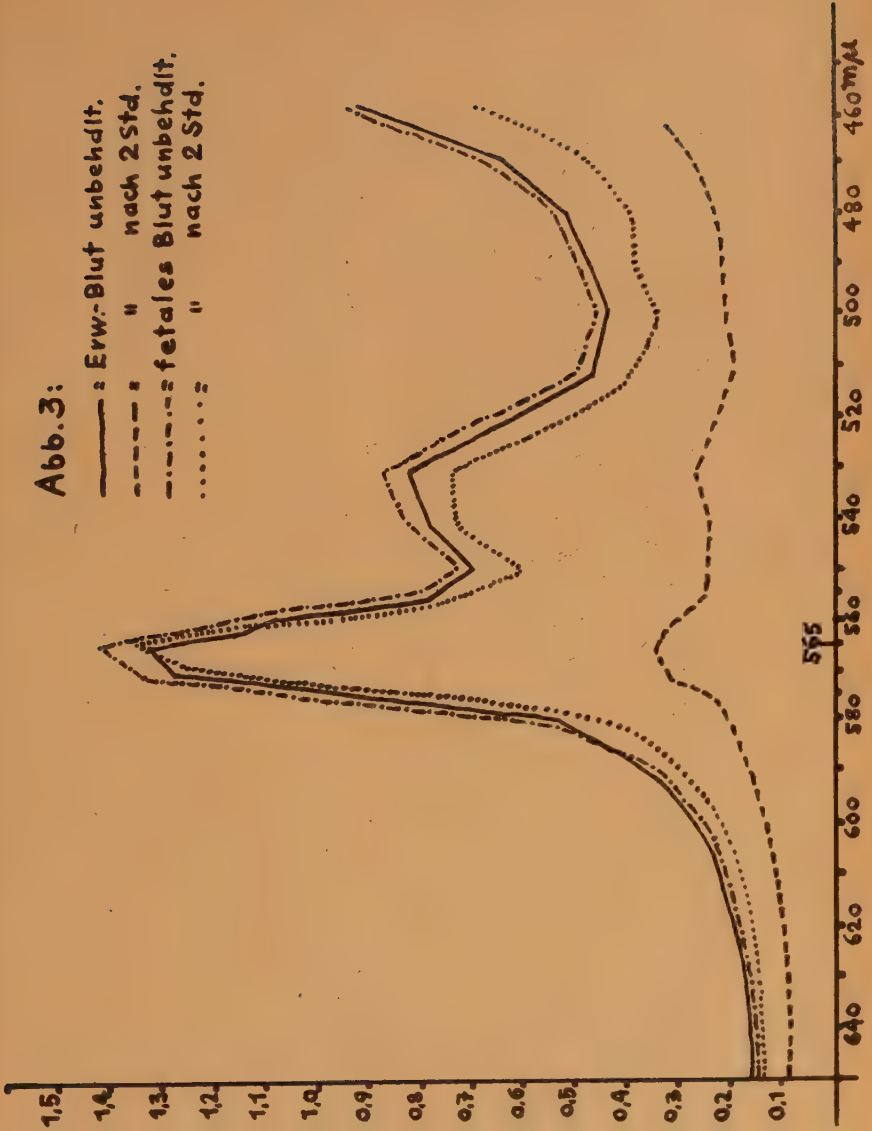
Abbildung 2

mm	1	1'	3	3'
700	0,215	0,21	0,13	0,20
650	0,15	0,135	0,09	0,145
640	0,15	0,14	0,09	0,14
630	0,16	0,15	0,09	0,16
620	0,20	0,19	0,11	0,15
610	0,23	0,215	0,12	0,175
600	0,26	0,25	0,13	0,21
590	0,34	0,335	0,17	0,27
580	0,54	0,55	0,20	0,44
575	0,86	0,92	0,235	0,78
570	1,28	1,34	0,33	1,24
565	1,33	1,44	0,35	1,38
560	1,1	1,17	0,32	1,03
555	0,79	0,83	0,25	0,73
550	0,70	0,73	0,24	0,61
540	0,80	0,84	0,25	0,74
530	0,84	0,89	0,265	0,75
520	0,63	0,67	0,23	0,52
510	0,47	0,50	0,195	0,39
500	0,44	0,46	0,20	0,35
490	0,475	0,51	0,215	0,39
480	0,53	0,55	0,225	0,41
470	0,65	0,68	0,27	0,49
460	0,92	0,94	0,36	0,71
450	1,6	1,6	0,53	1,20
440	1,9	2,0	0,86	1,95
430	---	---	1,53	---
420	---	---	1,3	---

Tabelle I: 1 = unbehandeltes Erwachsenenblut,
1' = unbehandeltes Fetenblut,
3 = Erwachsenenblut nach 2 Stunden
Behandlung in Pufferlösung,
3' = Fetenblut nach 2 Stunden Behandlung.

Abb. 3:

— = Erw.-Blut unbehdt.
 - - - = " " nach 2 Std.
 - . - . - = fetales Blut unbehdt.
 = " " nach 2 Std.



μ	1	1'	3	3'
700	0,27	0,20	0,16	0,235
650	0,185	0,135	0,085	0,15
640	0,22	0,14	0,08	0,15
630	0,145	0,145	0,09	0,19
620	0,215	0,15	0,10	0,17
610	0,23	0,175	0,11	0,215
600	0,265	0,20	0,145	0,24
590	0,34	0,255	0,155	0,27
580	0,50	0,42	0,19	0,42
575	0,77	0,74	0,255	0,61
570	1,13	1,17	0,32	0,91
565	1,23	1,30	0,38	0,98
560	0,94	0,95	0,33	0,76
555	0,69	0,70	0,25	0,56
550	0,59	0,57	0,26	0,51
540	0,70	0,68	0,26	0,57
530	0,69	0,70	0,28	0,60
520	0,53	0,52	0,245	0,47
510	0,42	0,37	0,22	0,38
500	0,37	0,345	0,20	0,36
490	0,39	0,37	0,20	0,37
480	0,435	0,415	0,24	0,43
470	0,53	0,49	0,275	0,49
460	0,75	0,68	0,35	0,63
450	1,30	1,18	0,53	1,0
440	> 2	> 2	0,93	1,9
430	----	----	1,8	> 2
420	----	----	1,35	1,9

Tabelle II: 1 = unbehandeltes Erwachsenenblut,
1' = " Nabelschnurblut,
3 = Erwachsenenblut nach 2 Stunden
Behandlung in Pufferlösung,
3' = Nabelschnurblut nach 2 Stunden
Behandlung.

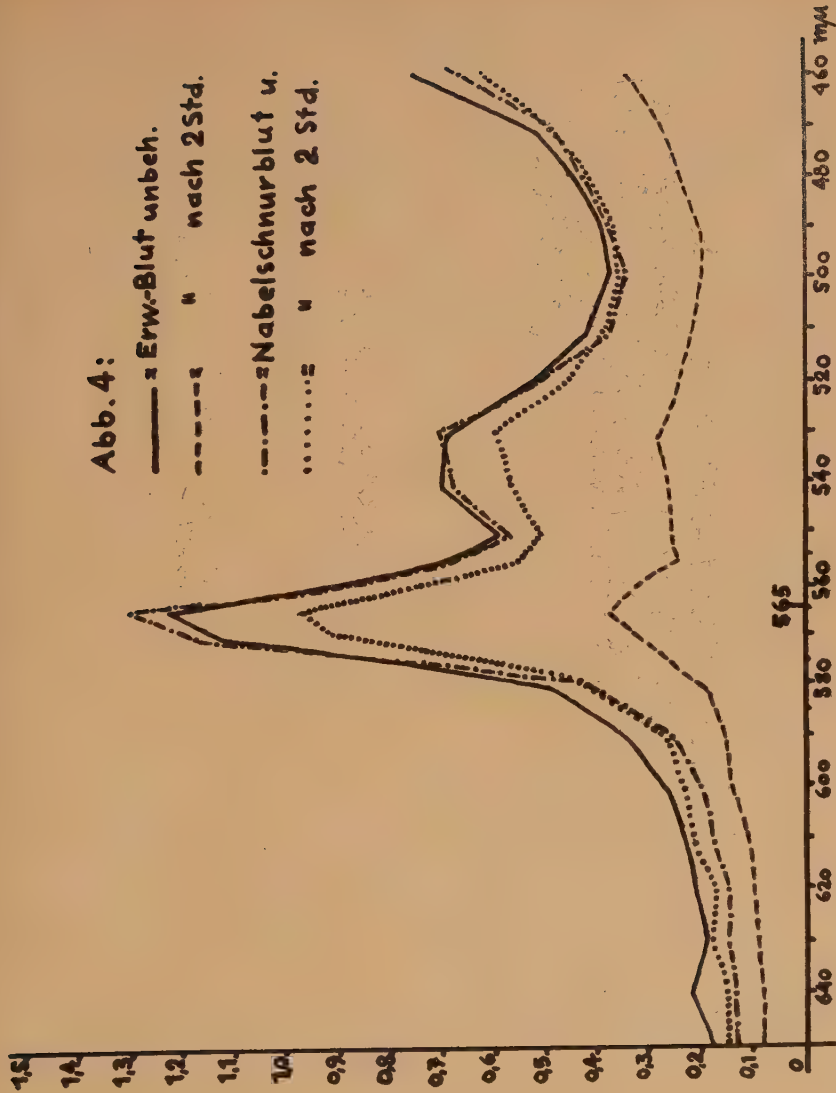
Abb. 4:

—— = Erw.-Blut unbeh.

- - - - = " " nach 2 Std.

- · - · - = Nabelschnurblut u.

· · · · · = " " nach 2 Std.



mm	Erw.n.	60'	120'	240'	360'
700	0,215	0,89	0,13	0,14	0,20
650	0,15	0,195	0,09	0,08	0,12
640	0,15	0,14	0,09	0,07	0
630	0,16	0,12	0,09	0,06	0,105
620	0,20	0,135	0,11	0,05	0,08
610	0,23	0,145	0,12	0,105	0,10
600	0,26	0,16	0,13	0,12	0,115
590	0,34	0,20	0,17	0,16	0,145
580	0,54	0,34	0,20	0,17	0,15
575	0,86	0,59	0,235	0,195	0,18
570	1,28	0,95	0,33	0,27	0,26
565	1,33	1,0	0,35	0,30	0,27
560	1,1	0,90	0,32	0,28	0,235
555	0,79	0,59	0,25	0,26	0,215
550	0,70	0,51	0,24	0,10	0,08
540	0,80	0,62	0,25	0,19	0,14
530	0,84	0,60	0,265	0,20	0,15
520	0,63	0,46	0,23	0,19	0,20
510	0,47	0,315	0,195	0,175	0,18
500	0,44	0,285	0,20	0,19	0,19
490	0,475	0,305	0,215	0,20	0,215
480	0,53	0,32	0,225	0,225	0,23
470	0,65	0,34	0,27	0,27	0,30
460	0,92	0,45	0,36	0,36	0,38
450	1,6	0,82	0,53	0,525	0,60
440	1,9	1,6	0,86	0,86	1,04
430	----	1,7	1,53	1,8	1,325
420	----	1,8	1,3	----	----

Tabelle III: Extinktionswerte für Erwachsenenblut:
Unbehandelt (n.) und nach 60, 120, 240 und 360
Minuten dauernder Behandlung mit Pufferlösung.

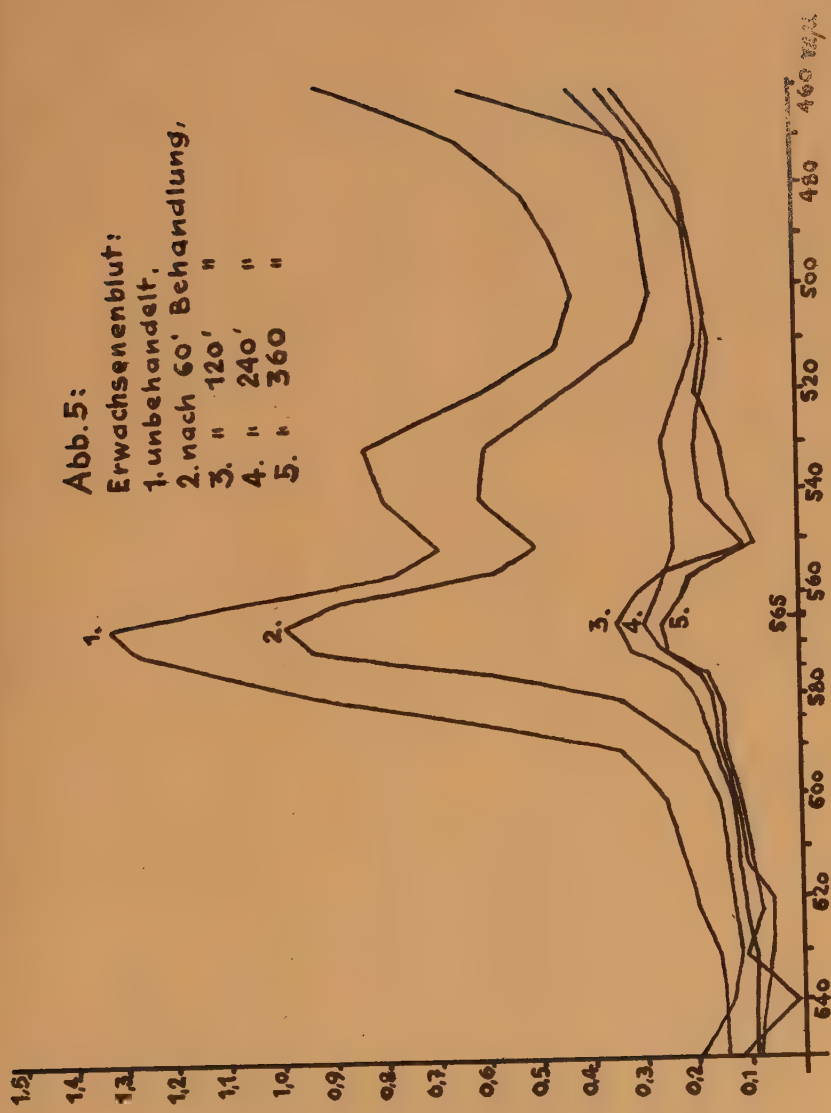


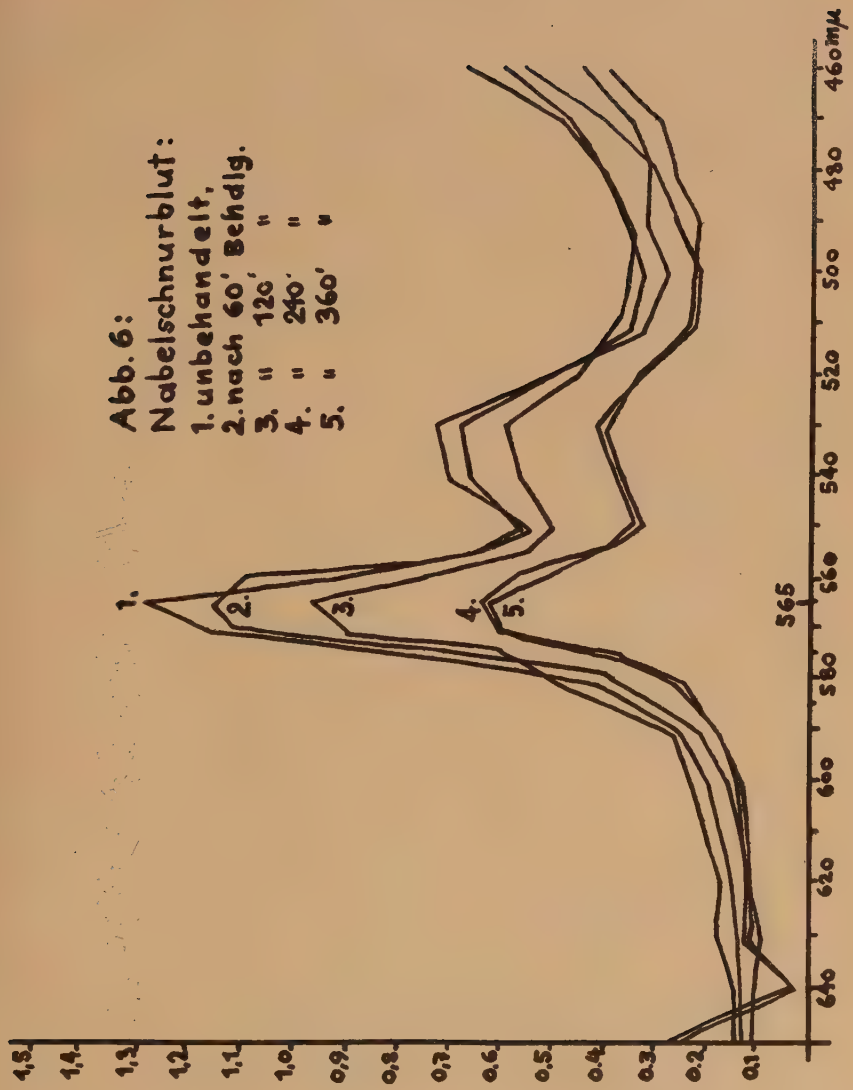
Abb. 5:

Erwachsenenblut:
 1. unbehandelt,
 2. nach 60' Behandlung,
 3. " 120' " "
 4. " 240' " "
 5. " 360' " "

mM	F n.	60'	120	240	360
700	0,20	0,17	0,235	1,00	1,00
650	0,135	0,11	0,15	0,255	0,25
640	0,14	0,11	0,15	0,03	0,03
630	0,145	0,10	0,19	0,12	0,115
620	0,15	0,14	0,17	0,12	0,12
610	0,175	0,13	0,215	0,14	0,135
600	0,20	0,165	0,24	0,145	0,145
590	0,255	0,22	0,27	0,18	0,18
580	0,42	0,39	0,42	0,265	0,255
575	0,74	0,67	0,61	0,39	0,38
570	1,17	1,14	0,91	0,61	0,61
565	1,30	1,16	0,98	0,64	0,63
560	0,95	1,10	0,76	0,56	0,53
555	0,70	0,68	0,56	0,41	0,40
550	0,57	0,56	0,51	0,35	0,34
540	0,68	0,71	0,57	0,38	0,37
530	0,70	0,73	0,60	0,41	0,40
520	0,52	0,52	0,47	0,335	0,33
510	0,37	0,33	0,38	0,235	0,23
500	0,345	0,29	0,36	0,235	0,23
490	0,37	0,23	0,37	0,22	0,23
480	0,415	0,32	0,43	0,265	0,26
470	0,49	0,36	0,49	0,31	0,305
460	0,68	0,46	0,63	0,42	0,40
450	1,18	0,93	1,0	0,70	0,56
440	2	2	1,9	1,55	1,45
430	----	----	----	2	2

Tabelle IV: Extinktionswerte Nabelschnurblut:
Unbehandelt (F n.), und nach 60, 120, 240 und
360 Minuten Behandlung in Pufferlösung.

Abb. 6:
 Nabelschnurblut:
 1. unbehandelt,
 2. nach 60' Behdlg.
 3. " 120' "
 4. " 240' "
 5. " 360' "



Zur Ermittlung der Zeitverhältnisse bei der Herauslösung des Hämoglobins aus dem Blute durch die Pufferflüssigkeit, wurden Erwachsenenblut und Nabelschnurblut noch gesondert untersucht. Es wurde in der gleichen Weise verfahren wie oben beschrieben, die blutgetränkten Filtrierpapierstreifen wurden jeweils 60, 120, 240 und 360 Minuten der Pufferlösung ausgesetzt. Die Tabellen III und IV zeigen die Ergebnisse, ebenso die Extinktionskurven auf den Abbildungen 5 und 6.

Setzt man für die Maxima der unbehandelten Lösungen 100% ein und berechnet auf Grund der Maxima der Extinktionskurven der Lösungen aus den Blutstreifen die 60, 120, 240 und 360 Minuten lang behandelt worden waren, den Prozentsatz des Hämoglobins, das zu diesen Zeiten von der Pufferlösung noch nicht aus den Erythrocyten herausgelöst war, so erhält man für:

Erwachsenenblut unbehandelt 100%

nach 60 Min. 75%

120 " 26%

240 " 22%

360 " 20%

Nabelschnurblut unbehandelt 100%

nach 60 Min. 89%

120 " 75%

240 " 49%

360 " 48%

Die Abbildung 7 stellt den Hb-Gehalt der Erythrocyten in Prozent nach den verschiedenen Behandlungszeiten dar, und die Gegenüberstellung der gefundenen Werte für Erwachsenenblut und Nabelschnurblut zeigt, daß die größten

Unterschiede nach einer Behandlung von etwa 2 Stunden sichtbar werden und daß nach einer längeren Dauer der Einwirkung der Pufferlösung auf die Streifen mit dem Blut (etwa 4 bis 6 Stunden) der Prozentsatz an noch vorhandenem fetalen Hämoglobin den des Hb A immer noch um mehr als das Doppelte übersteigt. Abbildung 8 zeigt diese Ergebnisse in einer Kurve. - Schon der Vergleich der behandelten Filtrierpapierstreifen (Abbildung 2) ließ einen Schluß in dieser Hinsicht ohne weiteres zu.

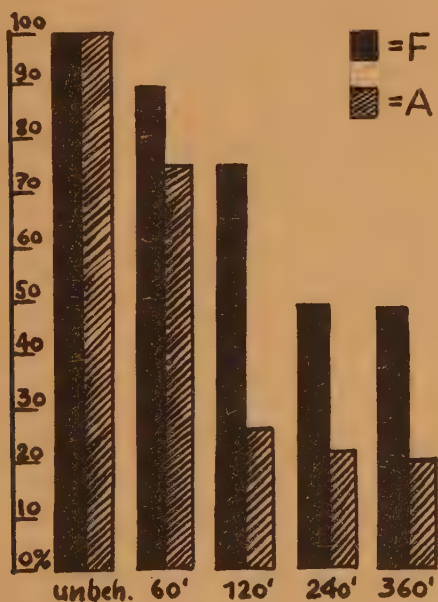


Abbildung 7: Hb-Gehalt der Blutproben in Prozent, nach den verschiedenen Behandlungszeiten.

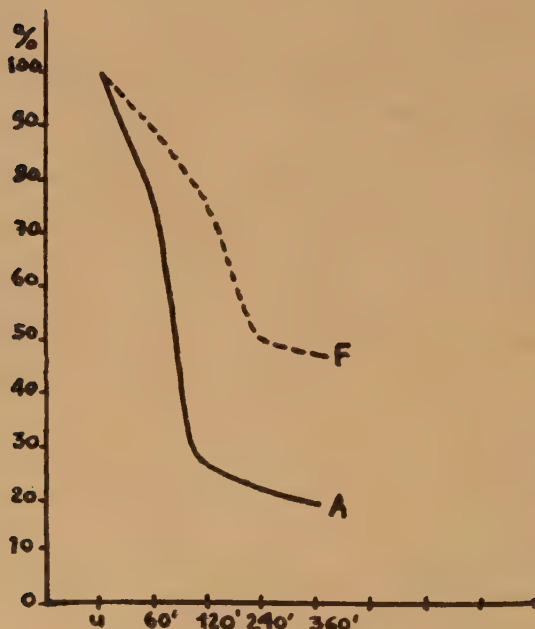


Abbildung 8: Hb-Gehalt der Blutproben in Prozent, nach den verschiedenen Behandlungszeiten.

Diskussion.

Die Versuche mit den Filtrierpapierstreifen bestätigen, daß die Möglichkeit besteht, eine qualitative Unterscheidung zwischen Erwachsenenblut und Fetalblut bzw. Nabelschnurblut auf diese sehr einfache Weise zu treffen. Fetales Blut und Nabelschnurblut lassen sich, wie die Ergebnisse zeigen, mit dieser Methode nicht voneinander unterscheiden. Was die Unterscheidung von Nabelschnurblut und fetalem Blut von Erwachsenenblut betrifft ist sie jedoch brauchbar. Schon das Aussehen der Test-

streifen nach zweistündiger Behandlung bietet beim Vergleich eine Unterscheidungsmöglichkeit.

Die spektralphotometrische Untersuchung und Messung der aus den Streifen gewonnenen Extrakte zeigt sehr deutliche Unterschiede, wie aus den Tabellen und Kurven hervorgeht. Der Umstand, daß es bei dieser Methode äußerst schwierig ist die verschiedenen Streifen mit Blut aus den verschiedenen Blutproben annähernd gleichmäßig zu durchtränken und genau gleiche Blutmengen auf die Streifen zu bringen, setzt allerdings der Genauigkeit der Messungen und der Ermittlung des Prozentgehaltes nach den verschiedenen Behandlungszeiten Grenzen und beschränkt die Methode auf qualitative Befunde. Die Gefahr, daß Fasern des Filtrierpapiers trotz des Zentrifugierens in den Extrakten zurückbleiben und die Messung beeinträchtigen ist sehr groß. Da außerdem bei dieser Methode mit Vollblut gearbeitet wird, muß mit einer Verunreinigung durch Plasma gerechnet werden, die zu beträchtlichen Fehlern bei der Messung führen kann.

Versuche über die verschiedene Löslichkeit von Hb A und Hb F aus getränkten Filtrierpapierstreifen bei der Behandlung mit Pufferlösungen wurden bisher nur mit reinen Lösungen beider Hb-Typen durchgeführt (32). Obwohl in den vorliegenden Untersuchungen nicht mit gereinigten, stromafreien Hämoglobininlösungen gearbeitet wurde, sondern mit dem Blut direkt, stehen die Ergebnisse in Einklang mit den Erfahrungen, die

bisher mit der Resistenz des fetalen Hämoglobins gegenüber Säuren und Laugen gemacht wurden. Man hat damit eine Methode in der Hand, die es erlaubt mit sehr einfachen Mitteln in verhältnismäßig kurzer Zeit (die besten Ergebnisse lagen bei 2 Stunden) eine qualitative Untersuchung von Blutproben auf das Vorliegen von fetalem oder Erwachsenenblut bzw. Hämoglobin, durchzuführen. Schon das Aussehen der 2 Stunden lang behandelten und dann getrockneten Papierstreifen läßt beim Vergleich mit einem in der gleichen Weise behandelten Teststreifen mit normalem Erwachsenenblut Schlüsse über die Art des enthaltenen Hämoglobins zu, eine spektrophotometrische Untersuchung auf dem hier beschriebenen Wege kann das Ergebnis objektivieren. Es wäre denkbar, daß dieses Verfahren auch zum qualitativen Nachweis von CO-Hb verwendet werden könnte, da sich dieses ähnlich wie Hb F verhält. Doch ist diese Methode nur brauchbar, wenn die Unterschiede deutlich genug sind, d.h., wenn fetales Hb in einem hohen Prozentsatz vorhanden ist, wie etwa im Nabelschnurblut mit etwa 70%. Dies dürfte aber bei CO-Hb nicht allzuoft der Fall sein.

Zusammenfassung.

Es wird über vergleichende Versuche an Erythrocyten fixierter Blutausstriche von Erwachsenenblut, Feten- und Nabelschnurblut berichtet. Durch Behandlung mit Zitronensäure-Phosphatpuffer von p_H 3,5 bei Zimmertemperatur und anschließender Methylenblaufärbung kann sichtbar gemacht werden, daß die Erythrocyten des Erwachsenenblutes nach einer Behandlung von 15 Minuten

hämoglobinfrei geworden sind und die Erythrocyten des fetalen Blutes und des Nabelschnurblutes noch Hämoglobin enthalten.

Es wird außerdem über eine einfache, qualitative Unterscheidungsmethode für fetales Blut oder Nabelschnurblut und Erwachsenenblut berichtet, die auf dem verschiedenen Verhalten der beiden Hb-Typen A und F gegenüber einer Pufferlösung von p_H 3,5 beruht und bei der in Nabelschnurblut und in Erwachsenenblut getauchte Filtrierpapierstreifen gleichzeitig mit diesem Puffer behandelt und dann verglichen werden. Aus den behandelten Streifen wurden Extrakte angefertigt und spektrophotometrisch untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen werden beschrieben.

Herrn Professor Dr. W. Laves danke ich für die Überlassung des Themas und eines Arbeitsplatzes im Laboratorium des gerichtlich-medizinischen Institutes der Universität München und für die freundliche Unterstützung die er mir bei der Durchführung der experimentellen Arbeit zuteil werden ließ.

Für die Überlassung der Feten und des Nabelschnurblutes danke ich Herrn Oberarzt Dr. Waidl von der II. Universitäts-Frauenklinik München, (Leitung Prof. Dr. Fikentscher).

Lebenslauf

Kurt H e r b s t , geboren am 7. April 1931
in Saubsdorf, Kreis Freiwaldau C.S.R.

1937 - 1941 Besuch der Volksschule in Saubsdorf,
1941 - 1945 der Oberrealschule in Freiwaldau.

1945 Fortsetzung der Schulausbildung an der
Mittelschule in Wanzleben, Bezirk Magdeburg
(Provinz Sachsen).

1947 Übersiedlung nach Bayern, vom gleichen
Jahre an Besuch der Oberrealschule in Landsberg
am Lech. Abitur 1951.

1951 - 1952 vorübergehend an der T.H. in
München (Architektur).

1952/53 Städtische Sprachenschule München
(Dolmetscherdiplom für Englisch).

Von 1953 bis 1959 Studium der Medizin an der
Universität München. Staatsexamen vom 3. März
bis 4. Juni 1959. Promotion am 16. Juni 1959.

